

# ČOVJEK (od stanice do organizma)

## KOLESTEROL I ALZHEIMEROVA BOLEST

M. Košiček, M. Malnar, S. Čermak, S. Katušić Hećimović  
Laboratorij za molekularnu neurofarmakologiju, Zavod za molekularnu medicinu



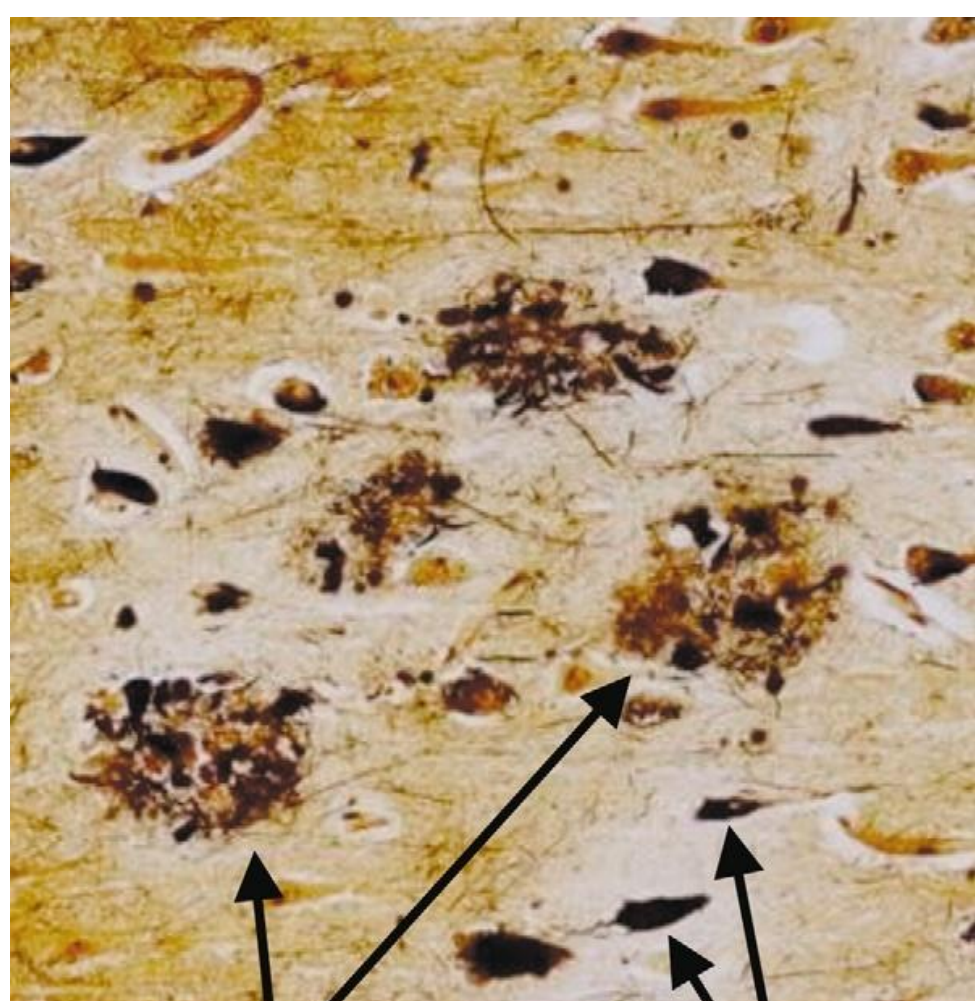
### UVOD



dr. Alois Alzheimer

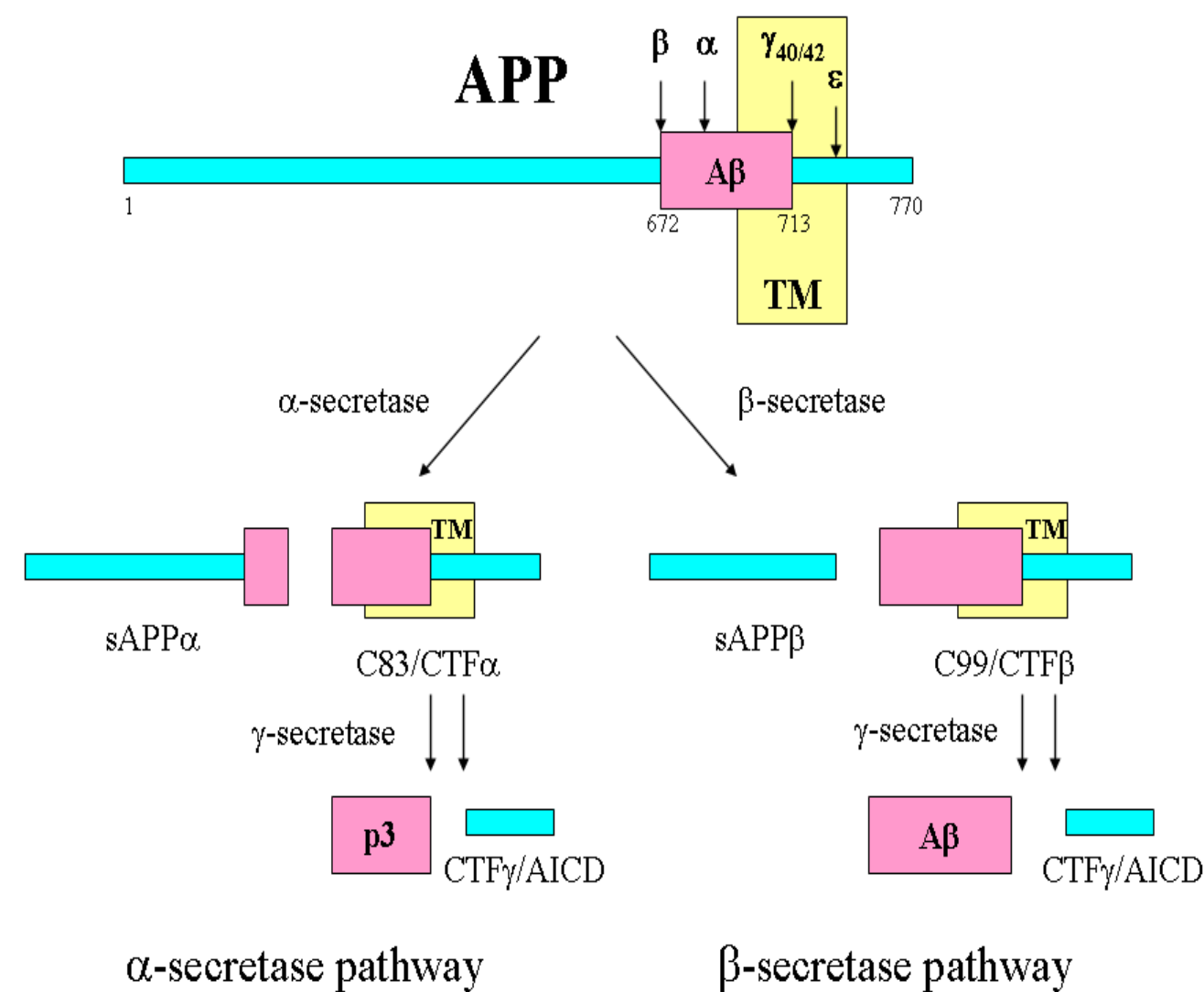
Alzheimerova bolest (AB) je vodeći uzrok demencije među starijom populacijom. Karakterizira je progresivni gubitak kognitivnih sposobnosti koji u konačnici rezultira gubitkom pamćenja i sposobnosti govora, poteškoćama u obavljanju rutinskih zadataka, dezorijentacijom te promjenom osobina ličnosti. Dr. Alzheimer je 1906. prvi uočio i povezao simptome bolesti s postmortalnim neuropatološkim obilježjima. Primijetio je veliki gubitak neurona te tzv. senilne plakove i neurofibrilarne snopice koji su bili vidljivi i golim okom (slika 1). Iako se dugo vremena AB smatrala bolešću starijih od 65 godina noviji podaci ukazuju da molekularni patološki procesi započinju 20 do 30 godina prije pojave prvih simptoma bolesti.

Glavni sastojak senilnih plakova je peptid amiloid- $\beta$  ( $A\beta$ ), koji nastaje sekvencijalnim cijepanjem proteina prekursora  $A\beta$  (protein APP) enzima koje nazivamo sekretaze (slika 1). Za nastanak peptida  $A\beta$  odgovorna je  $\beta$ -sekretaza koja cijepa protein APP u endosomima, dok cijepanje proteina APP na staničnoj membrani  $\alpha$ -sekretazom sprečava nastanak tog amiloidogenog peptida.



Plakovi      Neurofibrilarni snopici

**Slika 1.** Neuropatološke promjene u mozgu osobe oboljele od Alzheimerove bolesti (lijevo). Shematski prikaz metabolizma proteina APP (desno).



Nedavna istraživanja sve više ukazuju na ulogu kolesterola u nastanku Alzheimerove bolesti. Terapija statinima (lijekovima koji snižavaju razinu kolesterola), smanjuje rizik pojave bolesti, dok pacijenti s arterosklerozom pokazuju veću učestalost AB. Količina kolesterola u mozgu puno je veća u odnosu na ostala tkiva. Kod većine sisavaca u mozgu se nalazi oko 25% ukupnog tjelesnog kolesterola iako na mozak otpada manje od 10% tjelesne mase. Veza između kolesterola i razine peptida  $A\beta$  ustanovljena je i u Niemann-Pickovoj bolesti tipa C (NPC), nasljednom poremećaju nakupljanja sfingolipida uzrokovanoj mutacijama u NPC1 ili NPC2 genima. U NPC bolesti dolazi do nakupljanja neesterificiranog kolesterola i drugih lipida u kasnim endosomima i lizosomima (slika 2).

Slično kao u Alzheimerovoj bolesti, i u NPC bolesti dolazi do neurodegeneracije. Zanimljivo, u mozgu NPC pacijenata, te u mišjim i staničnim NPC modelima, također je primijećeno nakupljanje peptida  $A\beta$ . Kako istraživanja sve više ukazuju na utjecaj lipida na cijepanje proteina APP i nastanak peptida  $A\beta$ , bolest NPC je postala važnim modelom za proučavanje veze između kolesterola, proteina APP i nastanka peptida  $A\beta$ .

### METODE

- Western blot i ELISA
- RNAi metodologija
- Imunocitokemija i fluorescencijska mikroskopija
- Masena spektrometrija fosfolipida
- Odjeljivanje pojedinih staničnih organela
- Želja: primarne kulture neurona
- Stabilna i prolazna transfekcija stanica
- Želja: transgenični miševi

### PUBLIKACIJE

Kosicek M, Malnar M, Goate A, Hecimovic S. (2010) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 393: 404-9. (Cited: 7, IF: 2.55)

Malnar M, Kosicek M, Mitterreiter S, Omerbasic D, Lichtenthaler SF, Goate A, Hecimovic S. (2010) *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1802: 682-91. (Cited: 2, IF: 4.14)

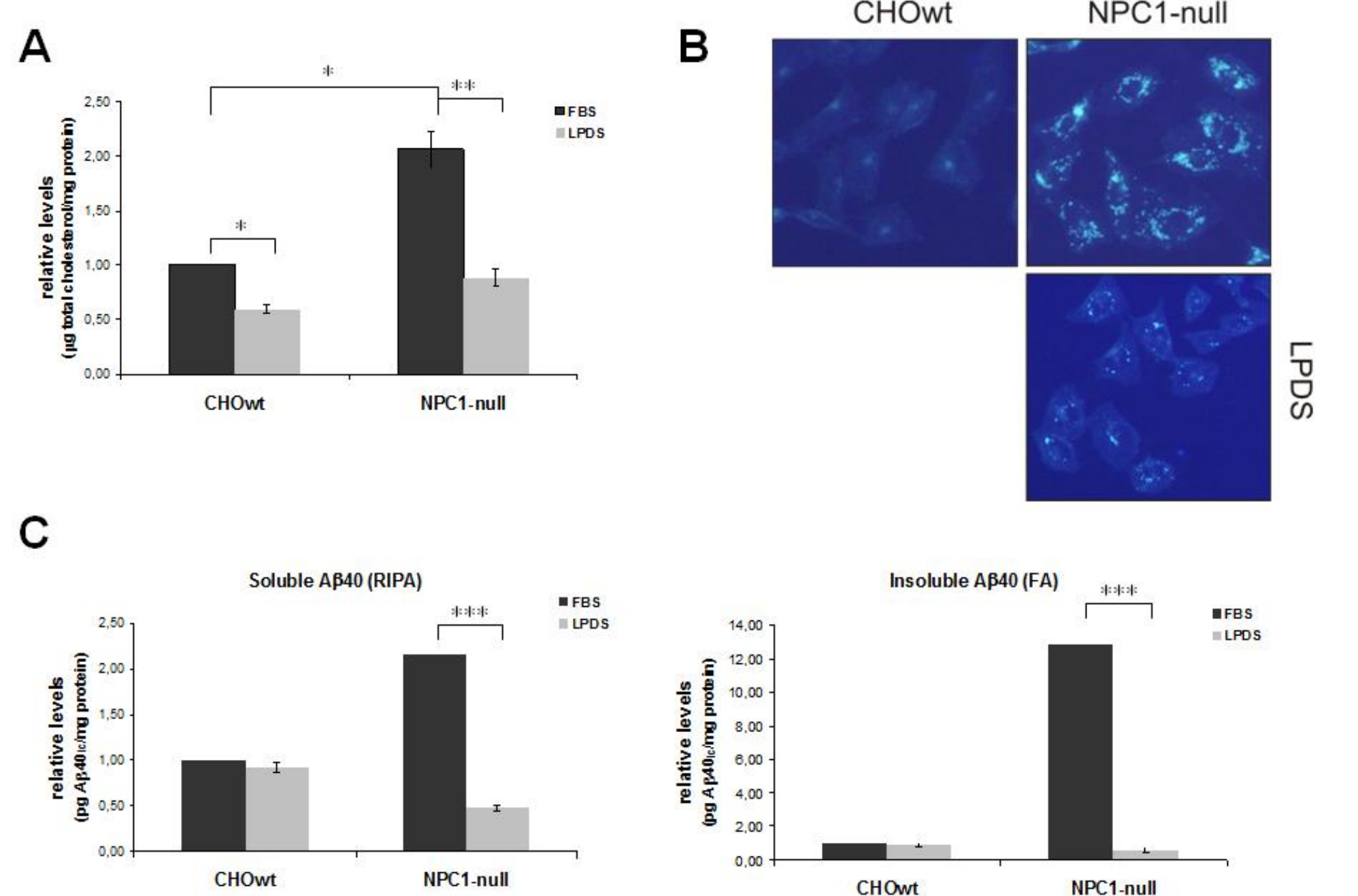
Kosicek M, Kirsch S, Bene R, Trkanjec Z, Titlic M, Bindila L, Peter-Katalinic J, Hecimovic S. (2010) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398: 2929-37. (Cited: 0, IF: 3.48)

### CILJ ISTRAŽIVANJA

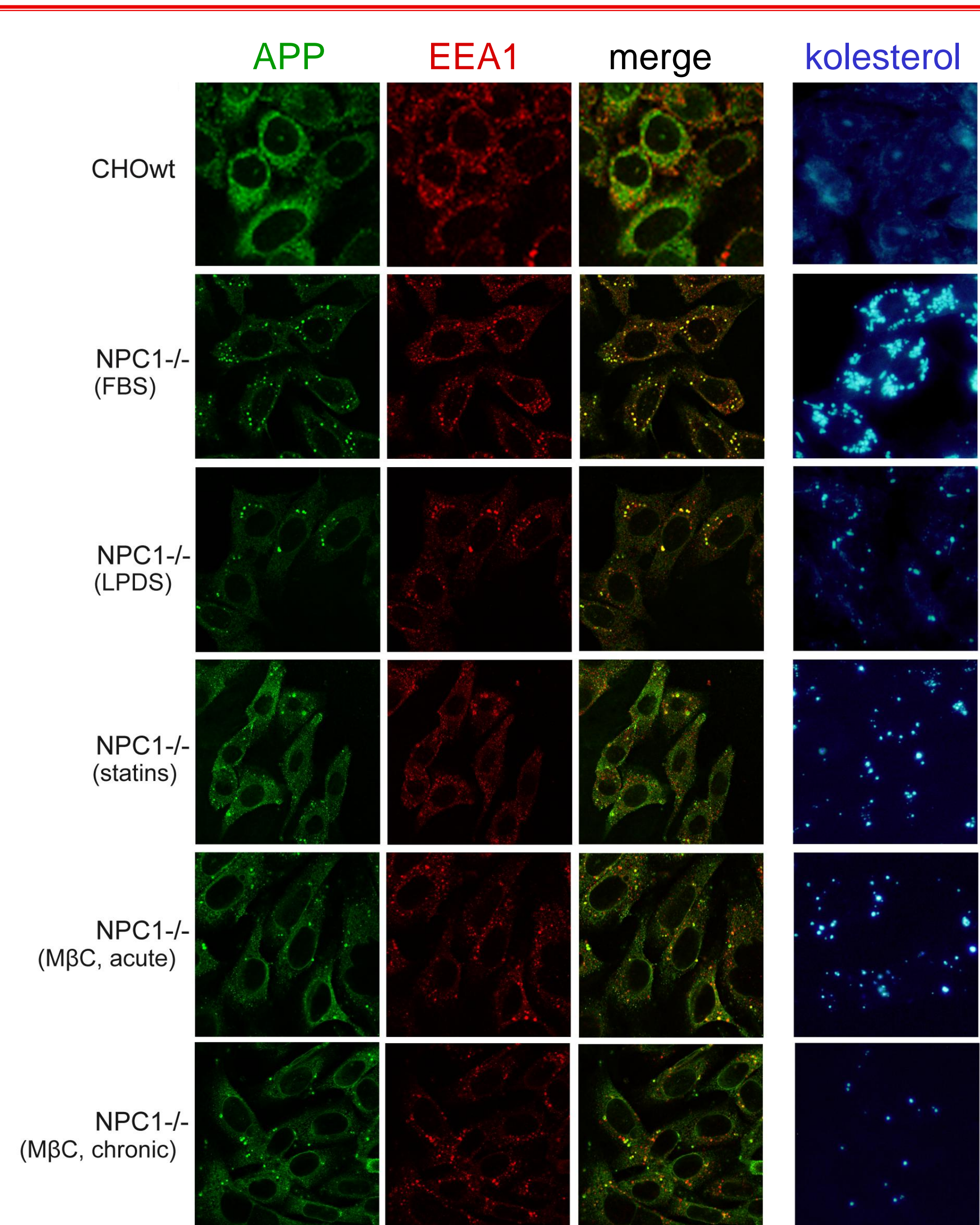
**HIPOTEZA:** Promjena metabolizma lipida je okidač nastanka neurodegenerativnih bolesti.

**CILJ ISTRAŽIVANJA:** Razjasniti mehanizam kojim kolesterol i drugi lipidi utječu na patogenezu Alzheimerove bolesti.

### REZULTATI



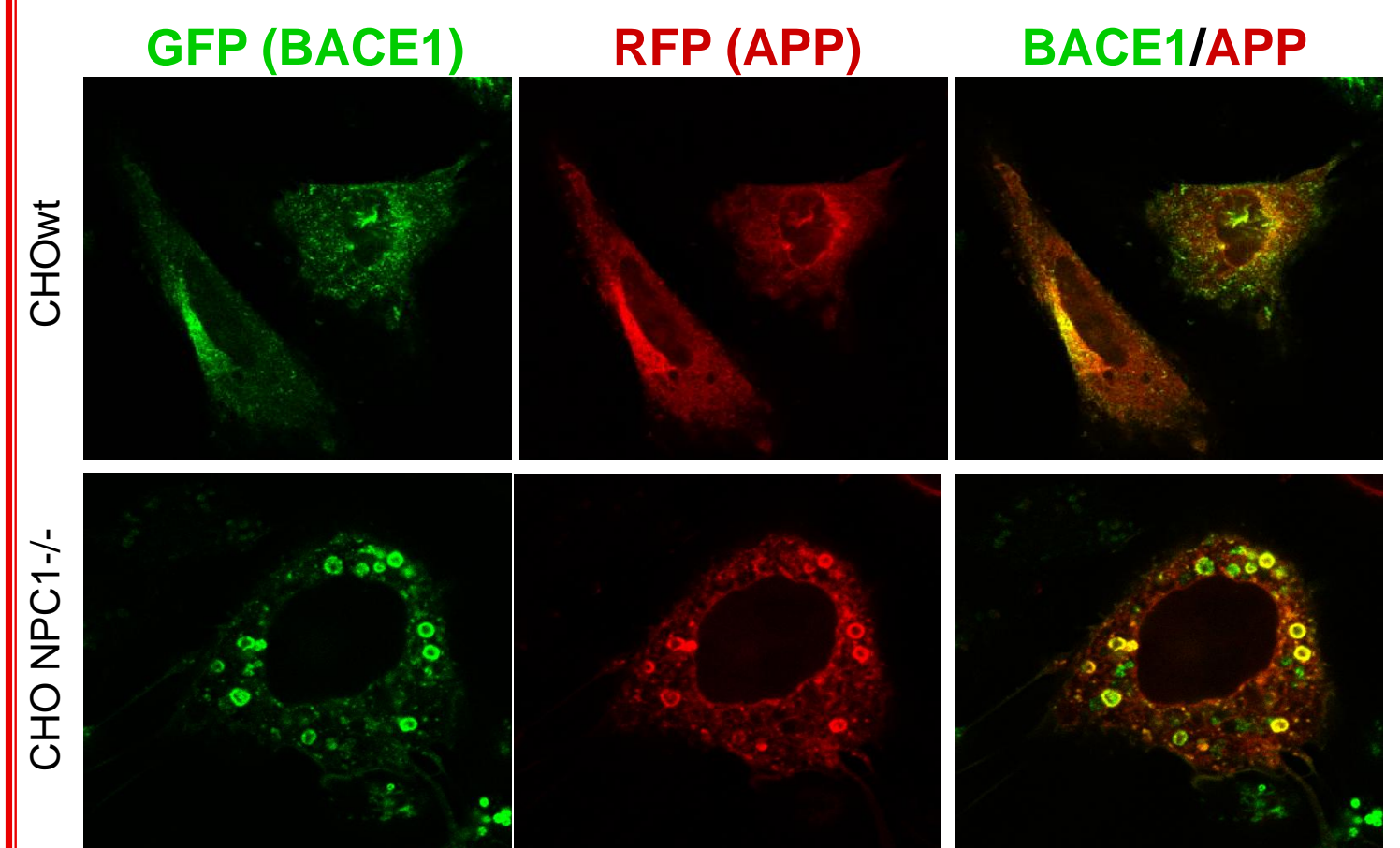
U svojim istraživanjima koristimo CHO-NPC1<sup>-/-</sup> stanice koje, kao i drugi NPC modeli opisani u literaturi, pokazuju nakupljanje kolesterola u stanici, te akumulaciju peptida  $A\beta$ . Mi smo pokazali da spuštanjem kolesterola u stanicama NPC1<sup>-/-</sup> dolazi i do spuštanja razine peptida  $A\beta$  čime dokazujemo vezu između kolesterola i nakupljanja peptida  $A\beta$ .



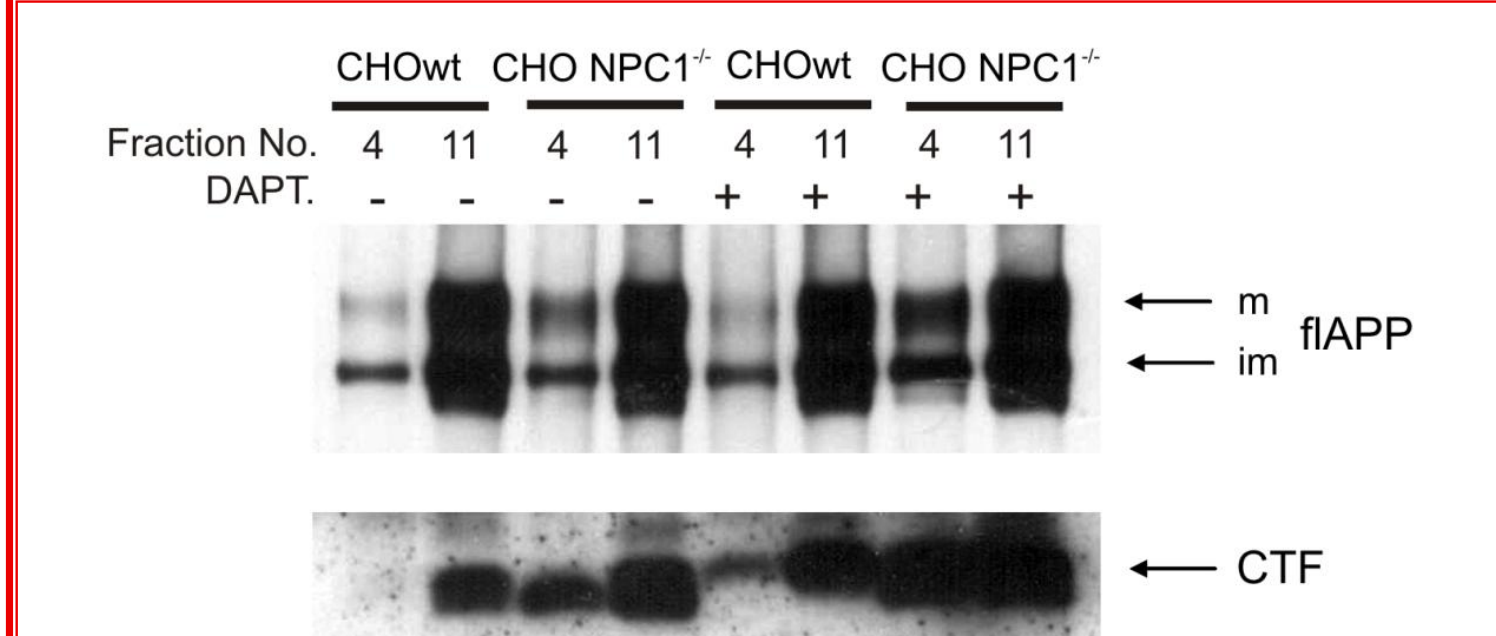
Vođeni hipotezom da nakupljanje kolesterola uzrokuje promjene u transportu proteina APP koje mogu dovesti do povećane proizvodnje peptida  $A\beta$  pratili smo smještaj i transport proteina APP u stanici. Pokazali smo da u NPC1<sup>-/-</sup> stanicama dolazi do nakupljanja proteina APP u ranim endosomima (EEA1 – biljeg ranih endosoma). Bitnije, naši rezultati također pokazuju da spuštanje kolesterola u tim stanicama uzrokuje smanjeno nakupljanje proteina APP u endosomima.

Ova istraživanja financirana su sredstvima Ministarstva znanosti obrazovanja i športa RH, projekt broj 098-0982522-2525, voditelj: dr.sc.Silva Katušić Hećimović.

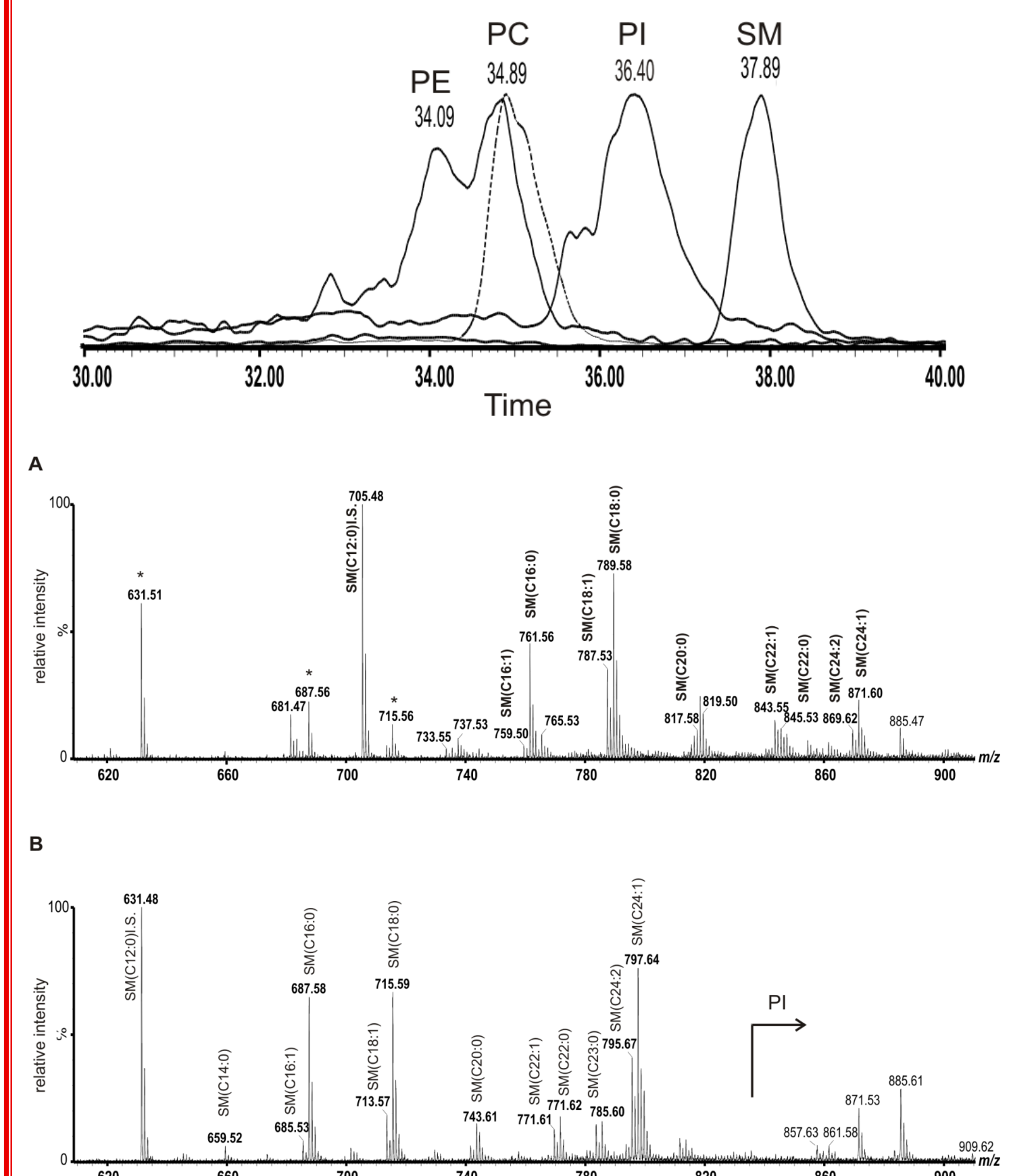
Zahvaljujemo našim kolaboratorima: A. Goate, S. Lichtenthaler, H. Steiner, C. Haass, J.P. Katalinić, H. Zetterberg.



Analizom smještaja proteina APP i enzima  $\beta$ -sekretaze (BACE1), koja je ključna za nastanak peptida  $A\beta$ , pokazali smo da u stanicama NPC1<sup>-/-</sup> uistinu dolazi do povećane kolokalizacije enzima i supstrata, čime je moguće objasniti povišene razine peptida  $A\beta$  u NPC modelima.



Naša istraživanja su pokazala da u stanicama NPC1<sup>-/-</sup> dolazi do povećane lokalizacije proteina APP i CTFa u lipidnim splavima. Lipidne splavi su membranske mikrodomene bogate kolesterolom i sfingolipidima koji prolazno interagiraju s različitim transmembranskim proteinima između ostalih i s proteinom APP te  $\beta$ -sekretazom.



Kako bismo detektirali promijene u lipidnom sastavu humanog likvora kod osoba oboljelih od Alzheimerove bolesti razvili smo nanoHPLC-MS metodu koja brzo i pouzdano detektira najvažnije skupine fosfolipida u mozgu Na slici je prikazan kromatogram i reprezentativni spektri sfingomijelina koji su u pilot studiji koju smo proveli pokazali značajno povećanje u likvoru osoba oboljelih od AB.